مقایسه روش‌های سریع و کم‌هزینه استخراج RNA با کیفیت و کمیت بالا از بافت میوه توت-فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Dush.)

زهرا بدوی[۱]، مصطفی رحمتی جنیدآباد*[۱]، خسرو مهدیخانلو[۲] و محمود کوشش صبا[۳]

[۱*] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

[۳] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

نویسنده مسئول: mr.joneid@gmail.com

چکیده

در آزمایش‌های زیست‌شناسی مولکولی مربوط به گیاهان، جداسازی و استخراج اسیدهای نوکلئیک با کیفیت و کمیت بالا، امری مهم است. بافت‌های گیاه توت‌فرنگی و خصوصاً بافت تشکیل‌دهنده میوه آن، غنی از پلی ساکاریدها و ترکیبات پلی فنلی است؛ بنابراین استخراج و جداسازی اسیدهای نوکلئیک از آن دشوار است. در تحقیق حاضر ۳ روش استخراج RNA کل شامل روش SDS-PCI، کیت استخراج RNA کل و روش SDS-EDTA از بافت میوه رسیده توت‌فرنگی مورد مقایسه قرار گرفتند. جهت ارزیابی کمیت و خلوص RNA استخراج‌شده حاصل از این سه روش مذکور، نمونه‌های استخراج شده به منظور اندازه‌گیری دو شاخص خلوص نسبت جذب نوری (A ۲۸۰/A ۲۶۰) و (A۲۳۰ /A ۲۶۰) در دستگاه نانودراپ قرار داده شدند و همچنین غلظت نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بهترین نسبت جذبی (۰/۰۷۱ ± ۲/۰۵۳ = A ۲۳۰/A ۲۶۰) و (۰/۰۵۴ ± ۲/۰۸۶ = A ۲۸۰/A ۲۶۰) با غلظت RNA کل ۰/۰۳۲ ± ۶۴۱/۲۵ در روش SDS-PCI به دست آمد. علاوه بر این، جهت ارزیابی یکپارچگی RNA استخراج شده از ژل الکتروفورز استفاده گردید. نتیجه ژل الکتروفورز شده RNA، نشان دهنده شفاف بودن باندهای ۲۸ s دو برابر باندهای ۱۸ s در روش SDS-PCI بود. همچنین از بهترین روش استخراج (SDS-PCI) در مقایسه با دو روش دیگر، ساخت cDNA انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که روش SDS-PCI، روشی آسان، سریع و اقتصادی برای استخراج RNA از بافت میوه توت‌فرنگی است.

کلمات کلیدی: استخراج RNA کل، پلی ساکاریدها، پلی فنل‌ها.

مقدمه

جداسازی اسیدهای نوکلئیک با کمیت و کیفیت بالا، پیش‌نیاز مطالعات تحلیلی بر روی ژنتیک، زیست‌شناسی مولکولی و سایر تحقیقات فیزیولوژیک مربوط به گیاهان است (Christou *et al*, 2014). استخراج RNA می‌تواند به‌عنوان عامل محدود کننده در آزمایش‌های زیست‌شناسی مولکولی نظیر خالص‌سازی mRNA و ساخت cDNA عمل کند. در حقیقت جداسازی RNA برای انجام آزمایش‌های ترانسکریپتوم و بیان‌ژن حیاتی است. با این حال، این عمل در برخی بافت‌ها و اندام‌های گیاهی به علت وجود مقادیر بالای متابولیت‌های ثانویه همانند پلی ساکاریدها و ترکیبات فنلی که می‌توانند به RNA متصل شوند، منجر به عملکرد ضعیف خواهد شد در نتیجه جداسازی RNA از چنین گیاهانی دشوار خواهد شد (Morante-Carriel *et al*, 2014 and Yu, *et al*, 2012).

میوه توت‌فرنگی یکی از بافت‌های بسیار پیچیده برای استخراج RNA است. گیاه توت‌فرنگی غنی از ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها است؛ بنابراین، جداسازی اسیدهای نوکلئیک با کیفیت و کمیت بالا از این گیاه، چالش برانگیز خواهد بود (Morante-Carriel *et al*, 2014 and Pandit *et al*, 2007). چندین روش کار برای جداسازی RNA از بافت گیاه توت‌فرنگی از جمله روش CTAB و Guanidinium thiocyanate مورد استفاده قرار گرفته است (Yu *et al*, 2012).

توت‌فرنگی با نام علمی (*Fragaria* × *ananassa*) میوه‌ای با اهمیت اقتصادی و ارزش تغذیه‌ای بالاست که به عنوان گیاه الگو در بین گیاهان میوه ریز و از لحاظ دستورالعمل‌های مربوط به ژنتیک، مطالعه ژن‌ها و عملکرد آن‌ها در خانواده

گل‌سرخیان[1]، اهمیت بالایی دارد (Zhang *et al*, 2011). در مطالعه حاضر، سه روش متفاوت برای جداسازی و استخراج RNA کل از بافت میوه توت‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفت. این روش‌های استخراج، نیازمند زمان و مقدار بافت مورد نیاز کمتری در مقایسه با سایر روش‌ها هستند. هدف از انجام این پژوهش معرفی روش‌های موفق استخراج RNA کل از بافت میوه توت‌فرنگی و همچنین معرفی یکی از بهترین این روش‌ها برای استخراج RNA سریع و کم‌هزینه با کیفیت و کمیت بالا است.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA از بافت میوه توت‌فرنگی به سه روش شرح داده شده زیر انجام گردید.

روش اول: استفاده از روش SDS-PCI

این روش مطابق روش شرح داده‌شده Christou *et al.* (۲۰۱۴) با کمی تغییرات انجام شد. به‌صورت خلاصه ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت میوه پودر شده در ازت مایع در میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری با ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (SDS ۱٪ و Tris-Hcl ۰/۵مولار) مخلوط گردید و به آن ۱ میلی‌لیتر فنل اشباع[2]، کلروفرم[3]، ایزوآمیل الکل[4] (PCI) به نسبت (۲۵:۲۴:۱) اضافه شد و با دور xg ۱۴۰۰۰ به مدت ۷ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شده و هم حجم آن PCI به آن اضافه گردید و همانند مرحله اول سانتریفیوژ انجام شد. دو مرتبه انجام این مراحل تکرار گردید. سپس محلول رویی برداشته شده و به منظور از بین بردن فنل اضافی سانتریفیوژ گردید. سپس به آن ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار با ۵/۶ =pH و ۱ حجم اتانول مطلق سرد اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. سپس با دور xg ۱۶۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب تشکیل داده شده با اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شده، رسوب در دمای محیط خشک شد و به آن حدود ۳۰ -۵۰ میکرو لیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه گردید.

روش دوم: مطابق دستورالعمل کیت استخراج RNA کل

حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت میوه پودر شده در هاون چینی به میکرو تیوپ منتقل کرده و ۴۰۰ میکرو لیتر بافر RT را به آن اضافه کردیم برای مخلوط شدن، به‌شدت ورتکس شده سپس سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه با بالاترین نیروی دستگاه انجام شد. محلول زیرین را به ستون Homogenization منتقل کرده سپس به مدت ۲ دقیقه در بالاترین سرعت دستگاه سانتریفیوژ انجام شد. به محلول زیرین ۳۵۰ میکرو لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه کرده، سپس به سرعت با سمپلر پایپت کردیم. پس از آن به ترتیب، انتقال ۶۵۰ میکرو لیتر از محتویات تیوپ که دارای مقداری رسوب بود به ستون، استخراج RNA موجود در کیت، سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با نیروی xg ۱۰۰۰۰ و دور ریختن محلول زیرین، افزودن ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر شستشو (wash buffer) و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با بیشترین سرعت و دور ریختن محلول زیرین انجام گردید. در مراحل بعدی، افزودن ۷۰ میکرو لیتر دئوکسی ریبونوکلئاز ۱ به مرکز غشا در ستون استخراج RNA جهت تخریب DNA ژنومیک و نگه‌داری کردن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، افزودن ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر دوم (Inhibitor Removal buffer)، سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با نیروی xg ۱۰۰۰۰، افزودن ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر شستشو به ستون و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با نیروی xg ۱۰۰۰۰ در دو مرحله انجام گردید. جهت اجتناب از آلودگی احتمالی ستون، باقی‌مانده بافر ستون استخراج را مجدداً در تیوپ جدید قرار داده و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با نیروی xg ۱۰۰۰۰ انجام شد. در انتها، افزودن ۵۰ میکرو لیتر آب Rnase free با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مرکز غشا در ستون استخراج انکوباسیون به مدت ۱ دقیقه و سانتریفیوژ مجدد آن به مدت ۱ دقیقه با نیروی xg ۱۰۰۰۰ انجام گردید.

روش سوم: روش SDS-EDTA

1- Rosaceae
2- Saturation Pheonl
3- Chloroform
4- Isoamyl alcohol

IrHC2019

مطابق با روش شرح داده‌شده Ghawana et *al* (۲۰۱۱) انجام گردید. به‌صورت خلاصه، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت میوه پودر شده در ازت مایع با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (فنل اشباع با pH= ۶/۷، SDS ۱٪، استات سدیم ۰/۳۲ مولار، EDTA ۰/۰۱ مولار و pH= ۸) مخلوط گردید سپس ۸۰۰ میکرو لیتر آب تیمار شده با DEPC به آن اضافه شد و هرکدام از آن‌ها به دو میکرو تیوپ ۲ میلی‌لیتری منتقل گردیدند. تیوپ‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شده سپس ۲۰۰ میکرو لیتر کلروفرم به هرکدام از آن‌ها اضافه گردید. به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده سپس ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شدند. در مرحله بعدی به مدت ۱۰-۱۲ دقیقه با دور RPM ۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. به محلول رویی ۰/۶ حجم ایزوپروپانول سرد اضافه گردید، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس همانند مرحله قبل سانتریفیوژ انجام گردید. محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب تشکیل داده شده ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه گردید و شستشو انجام شد. رسوب در دمای اتاق و در زیر هود خشک گردید و به آن ۳۰- ۵۰ میکرو لیتر آب تیمار شده با DEPC اضافه گردید.

تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده

RNA های استخراج شده طی فرایند خالص سازی و جداسازی دارای ناخالصی بوده که موجب کاهش غلظت آن و عدم واکنش با آنزیم‌های همانند سازی می‌شود. جهت ارزیابی کمی و سنجش غلظت RNA استخراجی از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذبی اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول‌موج جذبی پروتئین ها) استفاده شد. نسبت جذبی (A ۲۶۰/A ۲۸۰) نشان‌دهنده آلودگی‌های پروتئینی و(A ۲۶۰/A ۲۳۰) جهت بررسی میزان آلودگی‌های مواد معلق و قندها در محلول RNA استخراج شده است که توسط دستگاه نانودراپ محاسبه گردید. همچنین برای تعیین کیفیت از ژل الکتروفورز ۱٪ در بافر (TBE 0.5 X) استفاده شد که ژل با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. سپس با دستگاه ژل داک زیر نور ماوراء بنفش، تصاویر ژل مورد بررسی قرار گرفت. ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت ساخت شرکت NEB[۵] انجام پذیرفت.

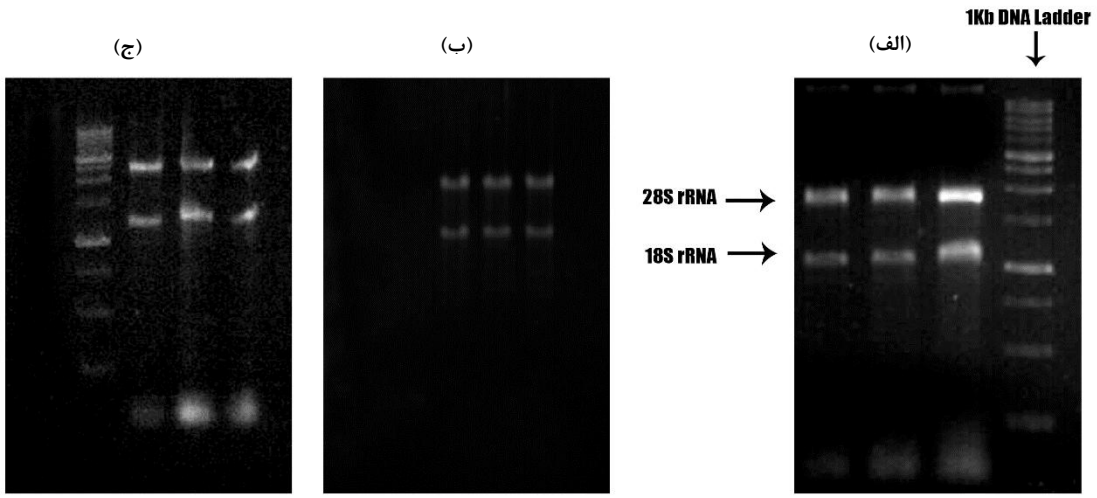
نتایج و بحث

در این مطالعه ۳ روش مختلف استخراج RNA از بافت میوه توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. در روش اول از روش SDS-PCI استفاده شد (شکل ۱- الف)، روش دوم مطابق دستورالعمل کیت Vivantis GF-1 Total RNA (شکل ۱- ب) و در روش سوم از روش SDS-EDTA استفاده گردید. هر سه روش بر اساس مشاهده عکس ژل الکتروفورز شده نتایج خوب و قابل‌قبولی داشتند و بر اساس نتایج حاصل از دستگاه نانودراپ و با توجه به میزان غلظت RNA های استخراج شده و نسبت جذبی آن‌ها روش اول با داشتن نسبت جذبی (A ۲۶۰/A۲۳۰) و (A ۲۶۰/A۲۸۰) به ترتیب ۰/۰۷۱ ±۲/۰۵۳ و ۰/۰۵۴ ±۲/۰۸۶ از قابلیت بالاتری برخوردار بوده اگرچه دو روش دیگر نیز قابل‌قبول بودند. در روش دوم نسبت به دو روش دیگر میزان غلظت RNA استخراج‌شده (۴/۹۹ ±۵۱/۴۶) از همه کمتر بود و بالاترین غلظت در روش اول به دست آمد (جدول ۱).

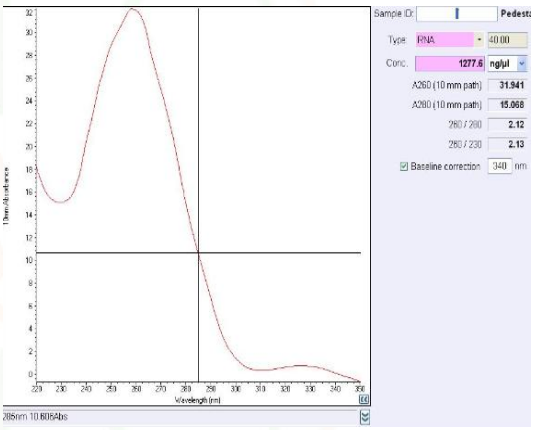
روش SDS-PCI و SDS-EDTA به دلیل استفاده از مواد ارزان‌تر و قابل‌دسترس‌تر از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر هستند. استفاده از روش SDS-PCI به دلیل داشتن غلظت بالاتر و حصول RNA با کمیت و کیفیت مناسب‌تر (شکل ۲) و همچنین به دلیل استفاده از محلول‌های ارزان و قابل‌دسترس، مناسب‌تر است و جهت ساخت cDNA برای انجام آزمایش‌های بعدی از این روش استفاده گردید (شکل ۳).

1- New England Biolabs

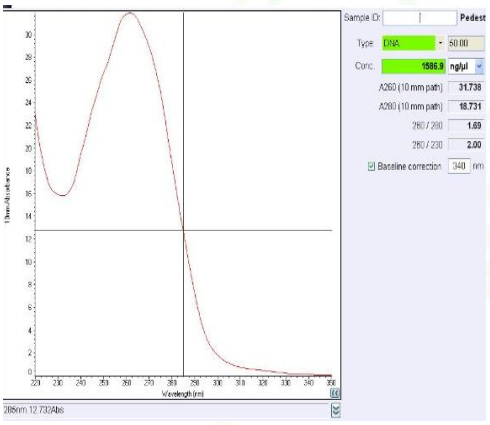
IrHC2019



شکل «۱»: RNA های استخراج‌شده به روش ۱ (الف)، روش ۲ (ب) و روش ۳ (ج) در ۳ تکرار.



شکل «۲» : تصویر از دستگاه نانودراپ نشان‌دهنده غلظت RNA استخراج‌شده و نسبت جذب نوری (A ۲۶۰/A ۲۳۰) و (A ۲۶۰/A ۲۸۰).



شکل «۳»: تصویر cDNA ساخته‌شده از RNA استخراج شده به روش SDS-PCI.

جدول۱- مقایسه غلظت و کیفیت RNA استخراج شده کل از بافت میوه توت‌فرنگی با استفاده از روش‌های مختلف

روش کار	وزن نمونه (mg)	نسبت جذبی ($A_{۲۶۰}/A_{۲۸۰}$)	نسبت جذبی ($A_{۲۶۰}/A_{۲۳۰}$)	غلظت µ(ng/l)	شواهد ژل RNA
SDS-PCI	۱۰۰	۲/۰۸۶± ۰/۰۵۴	۲/۰۵۳± ۰/۰۷۱	۶۴۱/۲۵± ۰/۰۳۲	سالم
کیت استخراج RNA	۱۰۰	۲/۰۲±۰/۰۵۵۷	۱/۷۵± ۰/۰۵۰	۵۱/۴۶± ۴/۹۹	سالم
SDS-EDTA	۱۰۰	۱/۵۹±۰/۰۰۶۶	۱/۰۶±۰/۱۳	۲۷۳/۷۳± ۷۵/۰۷۹	سالم و به‌صورت جزئی تخریب‌شده

IrHC2019

منابع

Christou, A., Georgiadou, E. C., Filippou, P., Manganaris, G. A. and Fotopoulos, V. 2014. Establishment of a rapid, inexpensive protocol for extraction of high quality RNA from small amounts of strawberry plant tissues and other recalcitrant fruit crops. Gene, 537(1): 169-173.

Ghawana, S., Paul, A., Kumar, H., Kumar, A., Singh, H., Bhardwaj, P. K. and Kumar, S. 2011. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. BMC research notes, 4(1): 85.

Morante-Carriel, J., Selles-Marchart, S., Martínez-Marquez, A., Martínez-Esteso, M. J., Luque, I., and Bru-Martínez, R. 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. Analytical biochemistry, 452: 46-53.

Pandit, S. S., Mitra, S. S., Giri, A. P. and Gupta, V. S. 2007. A quick method for isolating rsna from raw and ripe fleshy fruits as well as for co-isolating DNA and RNA from polysaccharideand polyphenol-rich leaf tissues. Journal of Plant Biology, 50(1): 60-64.

Yu, D., Tang, H., Zhang, Y., Du, Z., Yu, H. and Chen, Q. 2012. Comparison and improvement of different methods of RNA isolation from strawberry (*Fragaria ananassa*). Journal of agricultural science, 4(7): 51.

Zhang, J., Wang, X., Yu, O., Tang, J., Gu, X., Wan, X., and Fang, C. 2010. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.) during fruit development and maturation. Journal of experimental botany, 62(3): 1103-1118.

Comparison of rapid and inexpensive methods for the extraction of high quality and quantity Total RNA from strawberry fruit tissue (*Fragaria* × *ananassa* Dush.)

Zahra Badvi[1], Mostafa Rahmati-Joneidabad[1]*, Khosro Mehdikhanlou[2] and Mahmoud Koushesh Saba[3]

[1*] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agriculture Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

[2] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

[3] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

[*]*Corresponding Author*: mr.joneid@gmail.com

Abstract

The isolation of high quantity and quality of nucleic acids is a crucial step in the molecular biology studies in plants. The strawberry tissues, particularly the fruit, possess a considerable amount of polysaccharides and polyphenolic compounds .Thus, extraction and isolation of nucleic acids is difficult. In the present research, we comprised three methods of total RNA isolation including SDS-PCI, total RNA extraction kit and SDS-EDTA, from strawberry mature fruit. To evaluate the quantity and purity of extracted RNA obtained by above-mentioned methods, the total RNA samples were subjected to the Nanodrop 2000C (Thermo scientific, USA) for measurement of both purity indexes (A260 nm /A280 nm and A260 nm /A230 nm) absorption ratios and plus the quantity of studied samples. The result indicated the best absorption ratios (A260/A230= 2.053 ± 0.071) and (A260/A280= 2.086 ± 0.054) achieved by using the SDS-PCI method with total RNA concentration of 641.25 ±0.032. In addition, the samples run on gel electrophoresis to evaluate the integrity of isolated RNA. The results showed distinct bands of 28s and 18s rRNA, the 28s bands being approximately double as intense as the 18s bands in all extracted RNA in SDS-PCI indicating the intactness of RNAs. This method used to synthesis of cDNA for gene expression study in our work. The authors believe that the SDS-PCI method is easy, rapid and economical method for extraction RNA from the strawberry fruit.

Keywords: Total RNA extraction, Polysaccharides, Polyphenols.

IrHC2019